

Centre Technique Forestier Tropical

Division Pêche - Aquaculture

45 bis, Av. de la Belle Gabrielle

94736 Nogent-sur-Marne Cedex

**ADAPTATION D'ESPECES ET DE SOUCHES DE
TILAPIA A DES EAUX SAUMATRES :
étude des potentialités d'Oreochromis niloticus**

Martine AYELLA et Michel BORNANCIN

avec la collaboration de

N. Mayer-Gostan , A. Masoni et F.Sola^{*}

^{*} Laboratoire de Physiologie Cellulaire et Comparée
Faculté des Sciences , Parc Valrose
Université de Nice
06034 Nice Cedex - FRANCE

INTRODUCTION

Les poissons du genre Tilapia (= Sarotherodon = Oreochromis) sont caractérisés par une grande tolérance à un large éventail de conditions environnementales. Leur origine tropicale s'exprime par des préférences de températures allant de 12°C à 42°C (Chervinsky, 1982). Par ailleurs, beaucoup d'espèces présentent une euryhalinité marquée, et de nombreux travaux ont décrit ces espèces dans les estuaires ou les régions côtières d'Afrique (pour revue voir Stickney, 1986). Leur tolérance n'est pas limitée aux environnements salés mais également à une qualité d'eau médiocre. Leur croissance rapide et leur étonnante faculté de reproduction ont été des facteurs favorisant le développement de l'aquaculture du tilapia durant ces dernières années.

La compétition avec l'agriculture a créé des pressions pour un développement de l'aquaculture du tilapia en eau saumâtre (E saum.) ou en eau de mer (EM) (Payne, 1983). Cependant, il n'y a pas nécessairement adéquation entre les plus hautes salinités tolérées et les conditions de production optimale d'espèces de telles que Oreochromis niloticus qui sont choisies pour leur potentialités aquacoles, mais qui ne présenteraient pas une bonne euryhalinité (contrairement à T. mossambica).

Le but de cette étude était non pas de résoudre ces problèmes d'adaptation, mais plutôt **d'essayer de mieux comprendre certains aspects de la physiologie de ces animaux confrontés à des problèmes d'osmorégulation lorsqu'ils sont placés dans un environnement à salinité variable.**

L'espèce choisie pour cette étude fut Oreochromis niloticus (= S. niloticus = T. nilotica) étant donné l'intérêt qu'elle suscitait en Côte d'Ivoire pour le CTFT. Pour ce faire, nous avons choisi de suivre outre les paramètres plasmatiques, les modifications structurales et biochimiques de l'épithélium branchial.

Généralités sur la morphologie branchiale : (figures 1, 2 et 3)

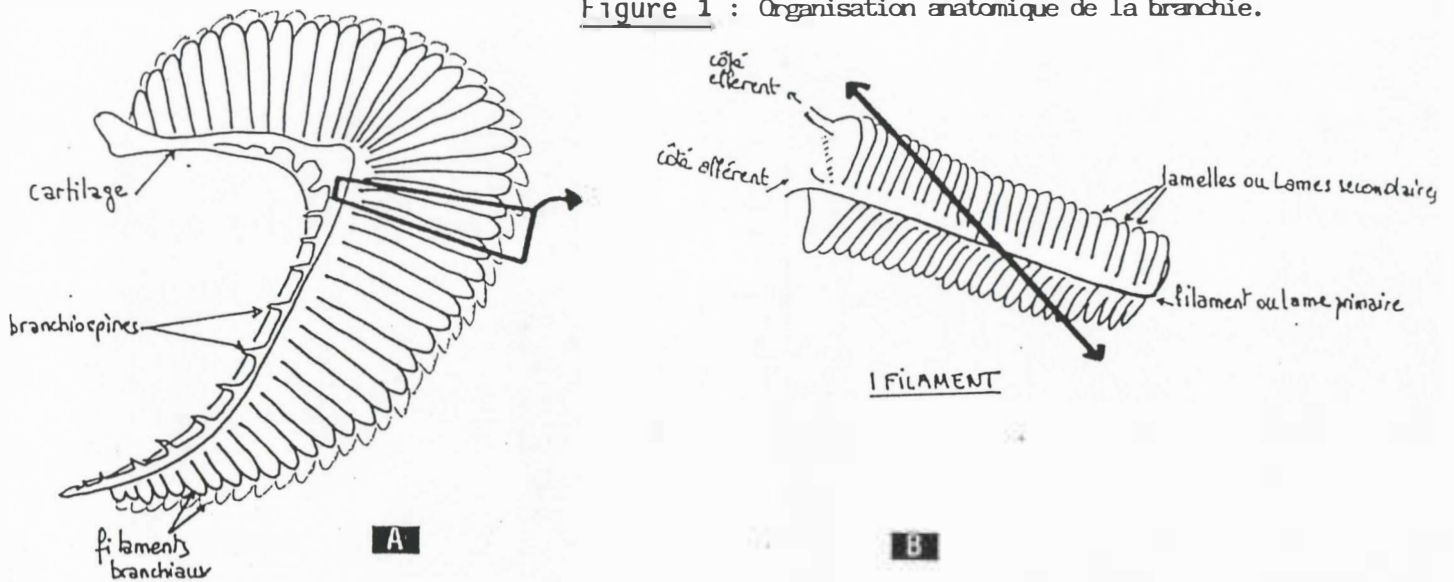
Les branchies des poissons, tant marins que d'eau douce, constituent une structure hautement organisée aux multiples fonctions : respiratoire, excrétrice et osmorégulatrice. Peut-être plus que la respiration, l'osmoregulation est le problème physiologique majeur des poissons marins comme d'eau douce (Smith, 1932). Ces animaux ont, en effet, l'obligation de maintenir la composition de leur milieu intérieur dans des limites relativement étroites de concentration, en dépit d'un milieu extérieur franchement hyper- ou hypo-osmotique. De nombreux travaux ont montré que la majeure partie des échanges ioniques (particulièrement Na^+ et Cl^-) s'effectuent au niveau des branchies, qui contribuent ainsi au maintien de l'équilibre hydrominéral et à la régulation de l'équilibre acido-basique du milieu intérieur. L'appareil branchial consiste en un arrangement complexe d'épithélia et de structures vasculaires sur un support squelettique, dont l'organisation anatomique correspond à 3 niveaux (figure 1 : A et B) :

- * les arcs branchiaux (4 paires),
- * les filaments ou lames primaires,
- * et les lamelles ou lames secondaires (Laurent, 1984).

Chez les salmonidés, il existe une double circulation branchiale irriguant 2 épithélia (Laurent et Dunel, 1978) :

- le sinus veineux central baigne la lame primaire (LP) : celle-ci, recouverte de cellules épithéliales, s'interrompt de place en place pour laisser émerger entre autres des "**cellules à chlorure**" (CC) responsables des transports ioniques en eau de mer (excrétion de NaCl) (figure 2 B)
- la circulation artérielle est en relation avec les lames secondaires (LS) recouvertes entre autres de cellules respiratoires (R). C'est au niveau de ces lamelles que s'effectuent principalement les échanges ioniques en eau douce (figure 2 A)

Figure 1 : Organisation anatomique de la branchie.



éviations

- Cellule respiratoire
- : Cellule à chlorure
- : Lame secondaire ou lamelle.
- : Lame primaire ou filament.

Figure 2 : Evolution de l'épithélium branchial chez les salmonidés au cours de l'adaptation à l'E.M.

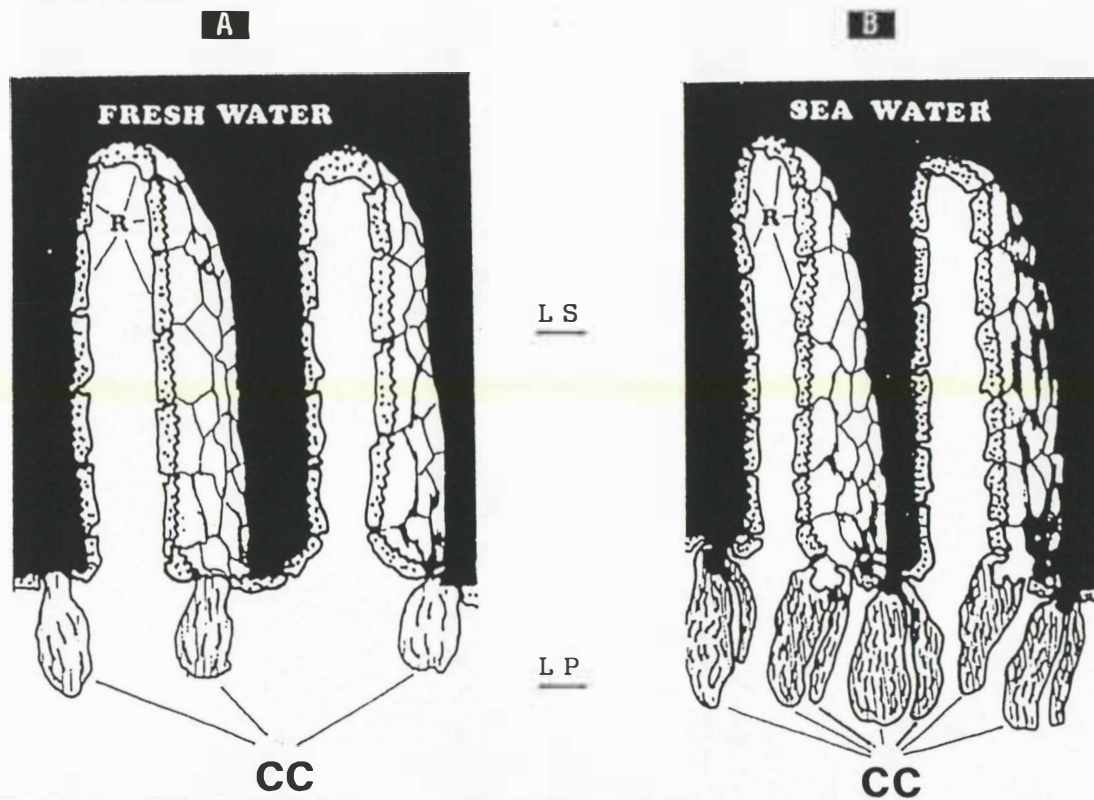
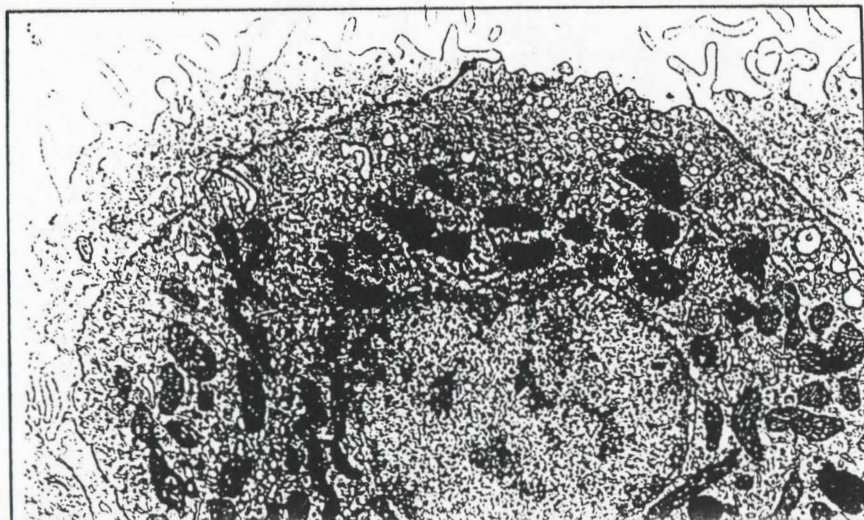


Figure 3

Ultrastructure
d'une CC



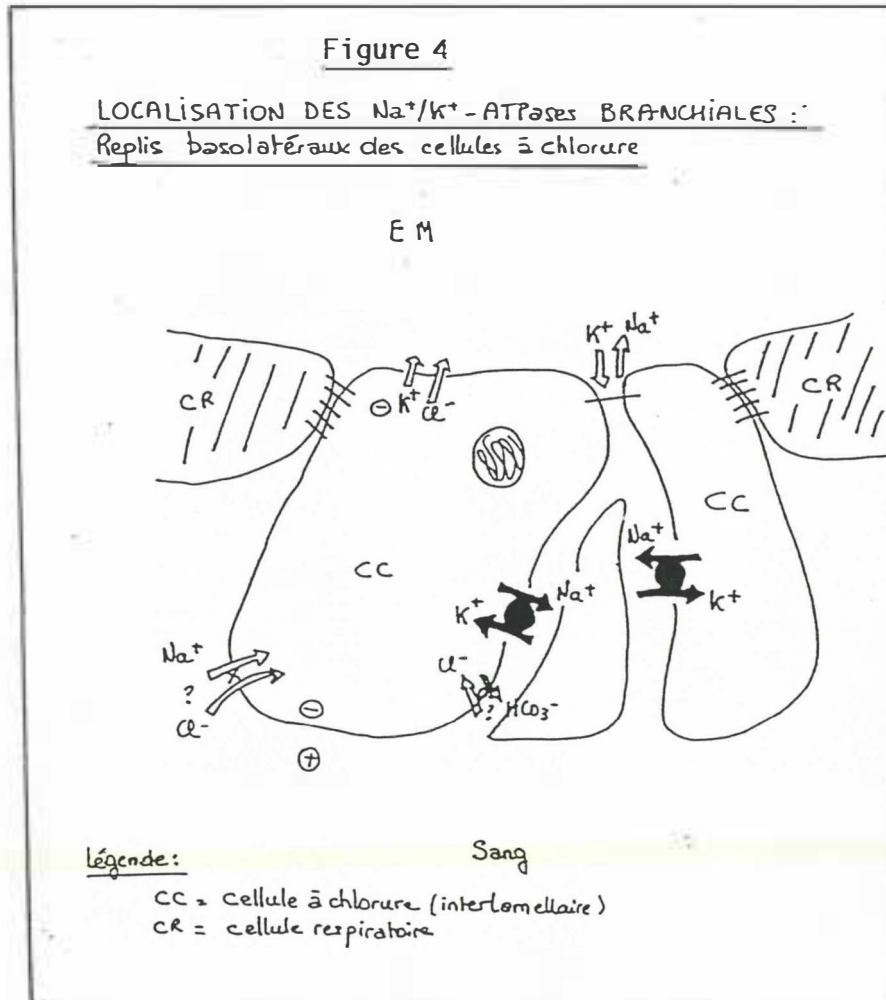
Chez les euryhalins (anguille, saumons, etc.) le passage d'eau douce en eau de mer entraîne des modifications structurales, en particulier une **réorganisation et une prolifération des cellules à chlorure interlamellaires** (figure 2). Celles-ci présentent une ultrastructure caractéristique : nombreuses mitochondries, extension des microvillosités de surface ainsi que des systèmes vésiculo-tubulaire cytoplasmiques (figure 3).

Généralités sur Na^+/K^+ -ATPase branchiale (figure 4) :

Toutes les cellules des métazoaires ont un contenu en potassium faible et en sodium élevé. Le maintien de la composante ionique interne est la conséquence du fonctionnement d'une pompe ionique excréant le sodium contre du potassium. Ce mécanisme d'échange actif consomme de l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP grâce à une ATPase Na^+/K^+ dépendante. Cette enzyme est membranaire, son fonctionnement dépend de la présence de Mg^{++} dans le milieu et son activité augmente en fonction de la concentration en ions Na^+ et K^+ , qui sont nécessaires tous deux à son activation.

Cette activité enzymatique mise en évidence dans les branchies des Téléostéens (Epstein *et al.*, 1967) est beaucoup plus élevée chez les poissons d'EM que chez ceux d'ED (Maetz et Bornancin, 1975). Chez les poisson marins, la présence d'une forte activité Na^+/K^+ -ATPasique dans les branchies est liée à l'excrétion active du sodium et de ce fait contribue à l'osmoregulation de l'animal (De Renzis et Bornancin, 1984). Par ailleurs, après séparation des cellules épithéliales des branchies, en 2 populations enrichies en cellules épithéliales et en cellules à chlorure (Sargent *et al.*, 1975), l'activité enzymatique s'est trouvée maximale au niveau des cellules à chlorure. Enfin, l'utilisation de la technique de marquage autoradiographique a permis de localiser cette enzyme au niveau des replis membranaires baso-latéraux de ces cellules (Karnaky, 1980). La figure 4

représente un schéma d'un complexe de cellules à chlorure interlamellaires avec la localisation supposée des échanges ioniques.



MATERIELS ET METHODES

1. MATERIEL BIOLOGIQUE

Les animaux de souche originaire de Côte d'Ivoire proviennent d'un élevage réalisé à l'INRA de Rennes. Ils ont été transportés à l'Université de Nice et maintenus dans les conditions ci-après décrites.

Les poissons sont nourris 3 fois par semaine à l'aide de granulés pour truite à 2% du poids corporel. Les poissons mâles et femelles sont mélangés. Ils sont maintenus à 27°C sous une photopériode de 8-9 h/jour. Ils sont placés en circuit fermé dans de l'eau douce filtrée. La densité d'élevage est de 9 à 10 kg/m³.

La composition de l'eau douce de Nice est la suivante :

$$\text{Na}^+ = 148 \mu\text{M}$$

$$\text{Cl}^- = 116 \mu\text{M}$$

$$\text{K}^+ = 14 \mu\text{M}$$

$$\text{Ca}^{++} = 1.585 \text{ mM}$$

$$\text{pH} = 7.89$$

$$\text{N est maintenu} < 0.1 \text{ mg/l}$$

Les diverses acclimations en eaux saumâtres ont été réalisées à l'aide d'eau de mer méditerranée diluée par de l'eau douce. La densité d'animaux dans ces milieux était de 2 à 5 kg/m³.

2. TRANSFERTS EN EAUX SAUMATRES

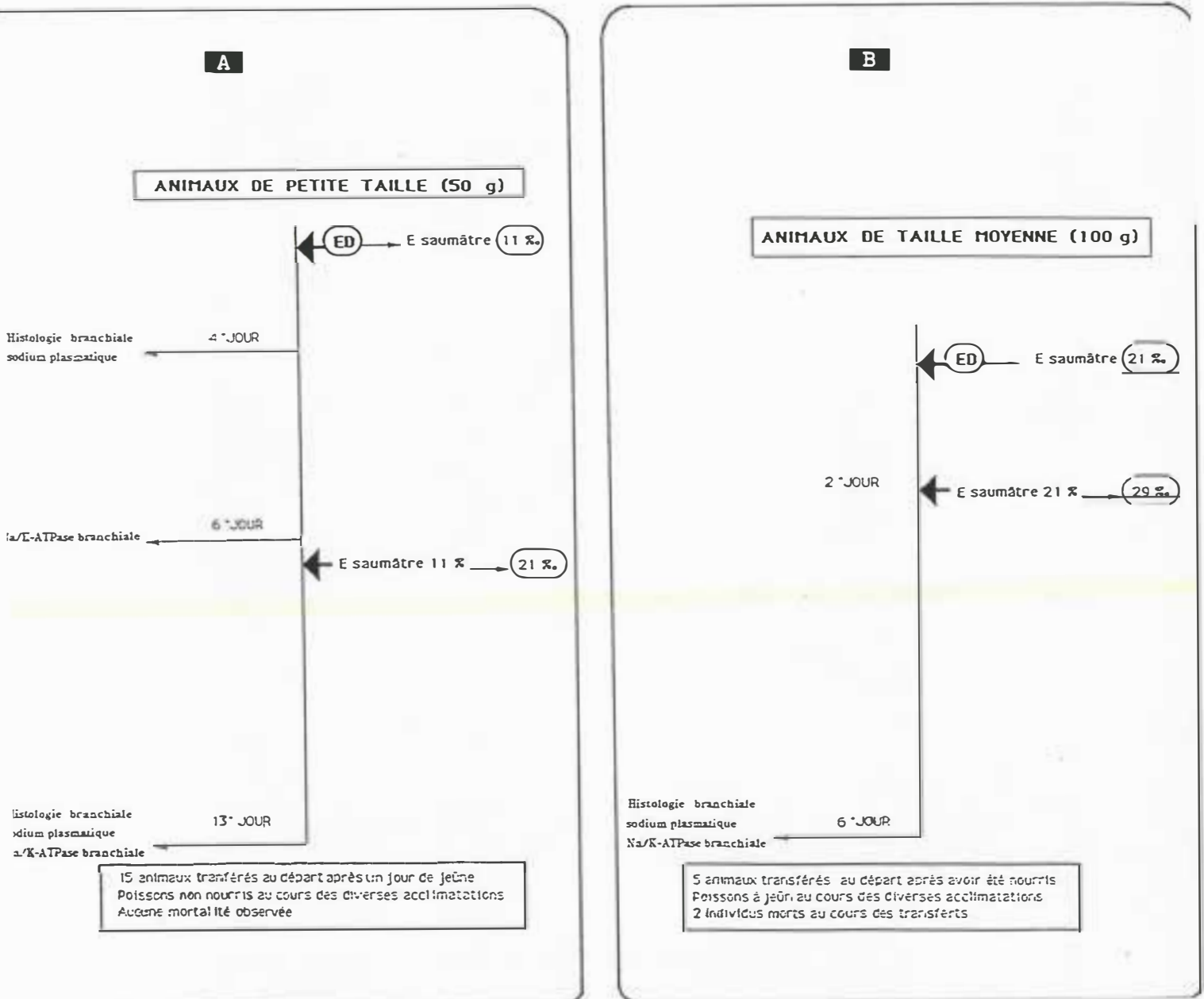
Deux types d'acclimatation (figure 5 : A et B) ont été réalisées sur des lots d'animaux de poids différents : poissons de 50 g et de 100 g. Dès leur transferts en E saum. (tableau 1), les animaux sont mis à jeûn et, ce jusqu'à leur sacrifice pour les prélèvements branchiaux et plasmatiques.

Milieus	Na (mM)	Salinité (‰)
ED (Nice)	0. 220	0
E saum.1	160	11
E saum.2	300	21
E saum.3	418	29
EM (Méditerranée)	515	36

Tableau 1 :

Caractéristique des eaux saumâtres obtenues par dilution d'eau de mer naturelle (Mer Méditerranée)

Figure 5.



3. ANALYSE MORPHOLOGIQUE

Etude en microscopie optique : fixation coloration de Champy-Maillet

Les arcs branchiaux sont rapidement collectés sur des poissons directement prélevés des divers bacs d'adaptation et d'élevage.

De petits fragments de filaments branchiaux sont fixés dans du liquide de Champy-Maillet (1959) pendant environ 10 heures, puis rincés et déshydratés. Ce fixateur permet une excellente préservation des tissus, et grâce à la réduction du tétroxyde d'osmium sur les structures phospholipidiques colore sélectivement **les cellules à chlorure** (voir résultats) **en noir** (Garcia-Romeu et Masoni, 1970).

4. ANALYSE PLASMATIQUE

Le sang est prélevé dans la veine caudale, centrifugé, la concentration en sodium plasmatique est déterminée à l'aide d'un photomètre à flamme Eppendorf.

5. ANALYSE BIOCHIMIQUE

Mesure des activités Na^+/K^+ ATPasiques branchiales :

Les prélèvements des arcs branchiaux sont effectués sur des animaux fraîchement tués. L'analyse est réalisée soit immédiatement, soit sur des échantillons extemporanément congelés sous azote liquide (-60°C) et décongelés au moment de l'étude biochimique.

Les branchies subissent un traitement visant à l'obtention d'une préparation enrichie en membranes plasmiques de cellules branchiales (microsomes) au niveau desquelles les enzymes (ATPases) sont localisées.

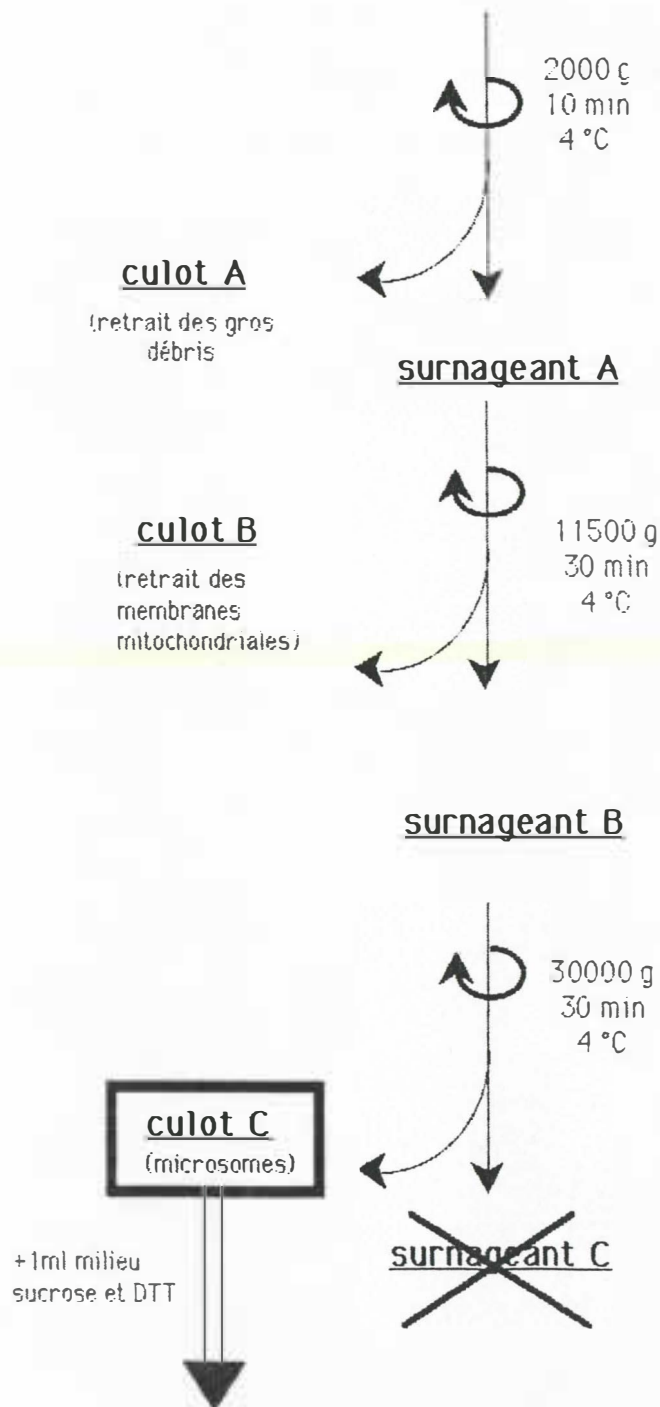
La préparation membranaire est la suivante (figure 6) :

Figure : 6

Préparation des membranes

Broyats de filaments branchiaux (8 arcs) dans une solution de sucrose à 10% contenant 1mM de Dithiothréitol (DTT)

pH = 7.41



**MESURE
ATPases
BRANCHIALES**

La technique consiste à mesurer la **quantité de phosphate inorganique** libérée en présence d'ATP-Mg⁺⁺, par la préparation membranaire d'échantillon branchial (contenant les enzymes ATPases) en présence de substrats Na⁺ et K⁺. L'activité de la Na⁺/K⁺-ATPase est mesurée par la différence d'amplitude de réponse de l'activité enzymatique en absence et en présence d'ouabaine, inhibiteur spécifique de cet enzyme. La mesure est effectuée selon la technique automatique décrite par Bornancin et De Renzis (1976).

RESULTATS :

Evolution des divers paramètres physiologiques, morphologiques et biochimiques chez Tilapia nilotica au cours des transferts en eaux saumâtres.

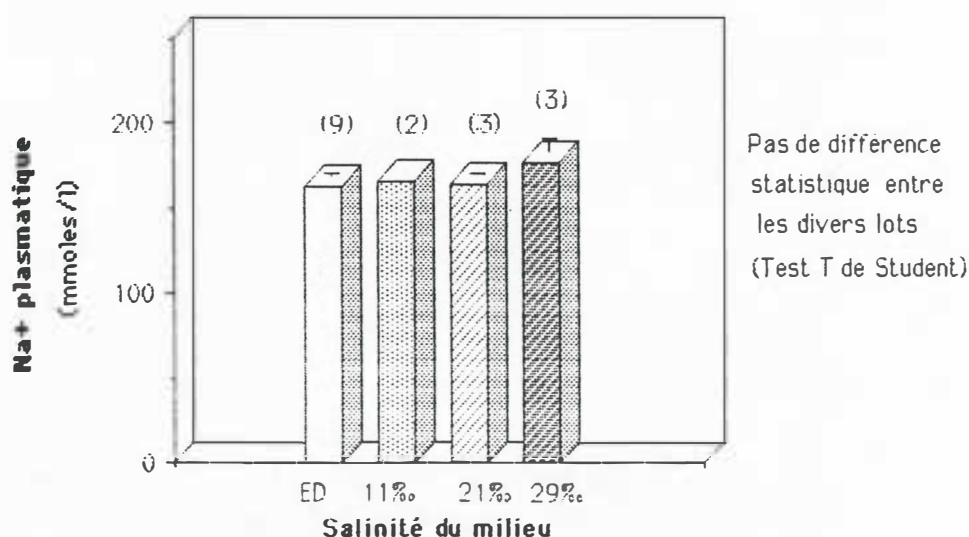
1. SODIUM PLASMATIQUE (figure 7)

Chez les animaux témoins maintenus dans l'eau douce de Nice, la concentration en sodium plasmatique est légèrement plus élevée que celle des truites provenant d'un élevage local. Elle est cependant plus basse que celle observée chez T. aurea en Côte d'Ivoire (voir tableau 3 en annexe pour comparaison). Néanmoins, la différence pourrait résulter d'une différence de sensibilité de la technique de dosage réalisée.

En ce qui concerne les diverses acclimations, la natremie n'est pas modifiée chez les animaux placés en eau saumâtre 11‰ puis à 21‰. Par contre, une augmentation sensible mais non drastique est observée après 4 jours en E saum. 29‰.

Conclusion : seules les fortes salinités (29‰) semblent affecter la concentration en sodium plasmatique.

Figure 7 :



2. MORPHOLOGIE BRANCHIALE (figure 8)

- Chez les poissons témoins (figure 8. A) :

- les lamelles sont courtes, ce qui supposerait une surface respiratoire faible par comparaison avec les salmonidés par exemple.
- il semble exister une vascularisation particulière différente de celle de la truite qui laisserait supposer un système à basse pression n'utilisant pas, au repos, tout le réseau circulatoire.
- l'innervation branchiale est très importante.
- en ce qui concerne les **cellules à chlorure**, elles sont **inexistantes au niveau lamellaire, et rares au niveau interlamellaire**.

Conclusion : l'observation d'une telle structure branchiale chez les poissons témoins (absence de cellules à chlorure) semblait être un obstacle à la survie en milieu salé.

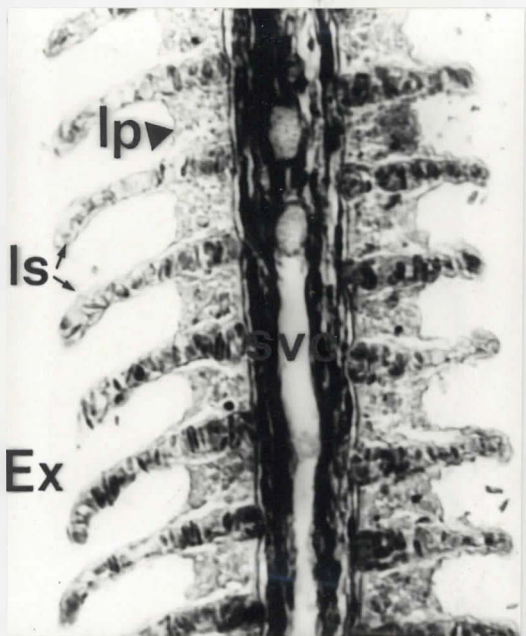
- Au cours des diverses acclimations :

- à 11‰: il se produit une **apparition de cellules à chlorure (CC)** interlamellaires (figure 8.B)
- à 21‰ : on observe une **augmentation** du nombre de CC interlamellaires (figure 8.C)
- à 29‰ : il se produit une stabilisation du nombre de CC interlamellaires comparativement à la situation précédente (figure 8.D). Cependant, des cellules de la lame primaire semblent **s'apparier avec les CC voisines ou augmenter de volume**.

Conclusion : des CC interlamellaires apparaissent dès l'élévation de la salinité externe (E saum. 11‰), puis prolifèrent jusqu'à un maximum qui se stabiliserait indépendamment de l'augmentation de la composition ionique du milieu. Leur réorganisation lors du transfert à forte salinité (29‰) s'apparenterait à celle retrouvée chez les euryhalins en EM.

Evolution de la morphologie branchiale au cours du transfert de Tilapia nilotica en eaux saumâtres.

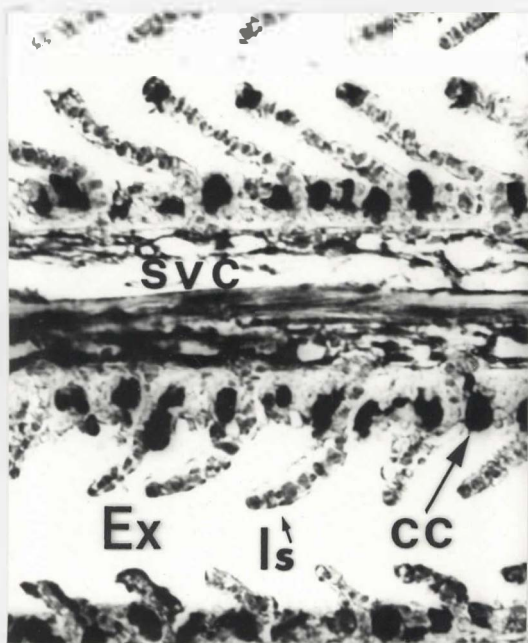
(Coloration Champy-Maillet)
(Grossissement x 330)



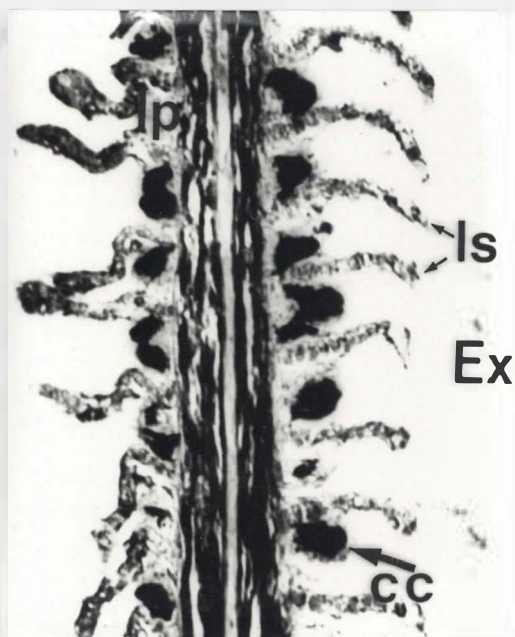
A Témoins ED



B E.saum. 11‰



C E.saum. 21‰



D E.saum. 29‰

Abréviations :

- Ex = milieu externe
- ls = lames secondaires (=lamelles)
- lp = lame primaire (=filament)
- cc = cellule à chlorure interlamellaire
- svc = sinus veineux central

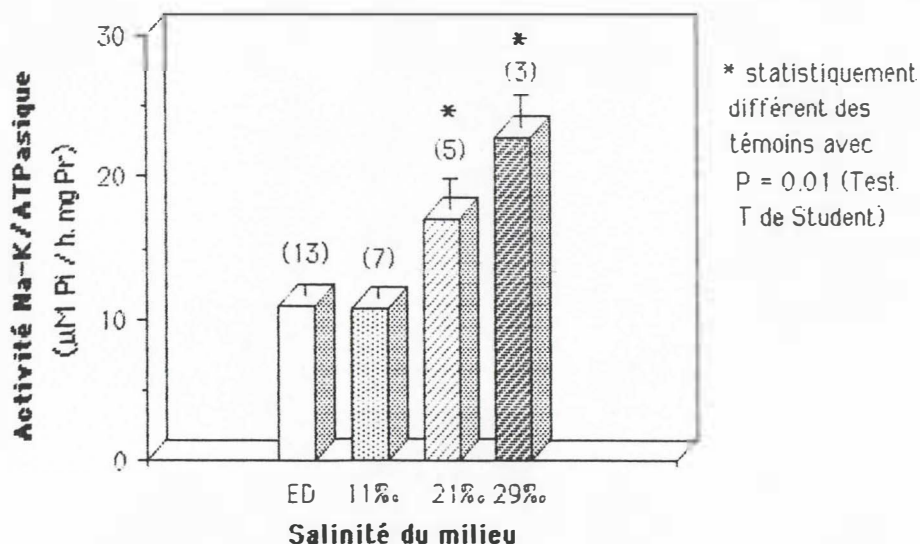
3. ACTIVITE Na^+/K^+ ATPasique BRANCHIALE (figure 9).

Les animaux témoins présentent une activité ATPasique comparable au cours des expériences et les résultats ont donc pu être regroupés.

Les poissons placés en E saum. 11‰ présentent une activité enzymatique identique aux témoins. Cela pourrait s'expliquer par le fait, que les individus placés dans un milieu proche de l'iso-osmoticité n'ont pas de difficulté à réguler leur balance osmotique, ou bien que le temps passé dans ce milieu était insuffisant pour la mise en place d'une stimulation de l'activité ATPasique.

L'augmentation de la salinité externe au-delà de ce seuil provoque une stimulation nette très significative d'un facteur 2 de l'activité enzymatique branchiale.

Figure 9 :



DISCUSSION ET CONCLUSION

Le but de ces expériences n'était pas une étude statistique de la mortalité des poissons en fonction de la salinité du milieu externe. Ainsi, la valeur absolue de tolérance de salinité (jusqu'à 29 ‰) n'est pas comparable aux valeurs observées en vraie grandeur où des études récentes ont montré une faible croissance et une mortalité importante parmi les diverses espèces de tilapia mises en élevage en eau saumâtre (Morissens, 1987 ; Doudet, 1986). En effet, les études effectuées en laboratoire où toutes les paramètres externes et internes sont contrôlés, sont difficilement réalisables sur le terrain, où l'objectif est la rentabilité, et où les animaux subissent sur des longues périodes des fluctuations non contrôlées des conditions environnementales.

L'intérêt de cette étude réside dans la nécessité d'une **meilleure compréhension de l'évolution des paramètres morphologiques et physiologiques** au cours de transferts dans des environnements à salinités croissantes. Cela dans le but d'une éventuelle amélioration de la survie de ces espèces en milieu saumâtre.

Nos travaux ont montré que chez T. nilotica en ED, les structures branchiales ressemblaient à celles présentes chez un poisson sténohalin d'eau douce, et rien ne laissait supposer chez les témoins des possibilités d'acclimatation en eaux saumâtres.

Nos transferts ont révélés que des structures connues pour fonctionner en EM (cellules à chlorure interlamellaires) apparaissent et se multiplient et ce, en association avec une stimulation de l'activité $\text{Na}^+/\text{K}^+ \text{ ATPase}$ branchiale.

Cependant, la salinité de 29‰ dans nos conditions, semble devenir critique pour les animaux puisqu'on observe une augmentation de la

natremie ainsi qu'un début de mortalité des animaux.

Ainsi, une **corrélation entre la morphologie et les possibilités de fonctionnement de l'épithélium branchial** en EM a été mise en évidence dans cette étude. Alors que ces animaux ont des difficultés de tolérance à la salinité sur le terrain, ils possèdent des **potentialités structurales et fonctionnelles d'adaptation** en milieu salé qui peuvent se révéler sous certaines conditions. Ces potentialités d'adaptation se sont avérées réelles en laboratoire après avoir monté la salinité à des taux élevés.

La réussite de ces acclimations, bien que réalisées à l'aide de lots d'importance non statistique pour l'extrapolation en vraie grandeur, pourrait s'expliquer de diverses façons, et particulièrement en examinant les conditions de transferts:

- avant le transfert : les conditions d'élevage préalable ont pu se trouver favorables à l'adaptation ultérieure. En effet, il s'est avéré que l'analyse de la composition ionique de l'eau de Nice a montré une eau 20 fois plus calcique que celle de Côte d'Ivoire (voir tableau 2 en annexe, à comparer avec la composition de l'eau de Nice dans la rubrique "Matériels et Méthodes" page 6). Or, le calcium est connu pour jouer un rôle dans la perméabilité cellulaire et dans les jonctions intercellulaires. En outre, peut-être permet-il une preadaptation à une composition plus proche de l'E saum. en ce qui concerne le calcium.

- au moment du transfert : dans le cas des petits animaux, ils ont été mis à jeûn 1 jour avant le passage en milieu salé. Ce procédé pourrait éviter une surcharge interne en sels et est connu pour favoriser l'adaptation à l'EM chez les truites. Par ailleurs, les transferts ont été effectués par paliers successifs à salinité progressivement montante, réduisant ainsi le stress osmotique.

- après le transfert : les animaux ont été laissés à jeûn, ce qui évite l'accumulation de sels, externe (nourriture salée non ingérée par les

poissons, se déposant au fond de l'eau ; accumulation de décrets ammoniacés Nitrites-Nitrates toxiques) et interne (ingestion de nourriture salée absorbée au niveau du tube digestif).

Cependant dans ces conditions, nous ne sommes pas à même de connaître le comportement de ces animaux face à l'apport de nourriture, ni leur taux de croissance à long terme.

Ce projet pourrait se compléter sur cette espèce des façons suivantes :

- * augmentation du nombre d'animaux transférés dans nos conditions, de manière à apprécier leur mortalité réelle en laboratoire ; apport de nourriture quelques jours après le transfert.
- * étude fine de la circulation branchiale, conditionnant les échanges ioniques ainsi que leur intensité.
- * étude du fonctionnement branchial proprement dit, par le biais de mesures directes de transports ioniques branchiaux (flux isotopiques transbranchiaux réalisés à l'aide de la technique de la tête isolée et perfusée, mise au point chez la truite et qu'il serait nécessaire d'adapter sur tilapia) ; en effet, les mesures d'activité ATPasique s'effectuent sur des préparations membranaires avec apport exogène de substrats, et elles n'impliquent pas obligatoirement que les enzymes soient réellement fonctionnelles et participent à l'excrétion du chlorure de sodium dans les conditions naturelles.
- * étude ultrastructurale et fonctionnelle du comportement du tube digestif lors des transferts en eaux saumâtres.

Enfin, cette étude pourrait s'étendre à d'autres espèces africaines ayant des possibilités d'adaptation plus larges dans le but d'avoir des données comparatives, ou bien sur des espèces d'intérêt économique important.

ANNEXE

Nos résultats seront à comparer avec les données mesurées en Côte d'Ivoire sur les espèces Tilapia aurea, et hybrides T. aurea x T. nilotica.

Tableau 2

Milieus d'adaptation de Côte d'Ivoire :
concentration ionique des principaux sels (mM)

	ED	E saum : (9‰)	E saum : (19‰)
Na ⁺	0.220	130	266
K ⁺	0.030	4	8
Ca ⁺⁺	0.125	3	6.5

Tableau 3 :

Concentrations plasmatiques en sodium (mM) chez diverses espèces de Tilapia au cours des acclimations en eaux saumâtres

Espèces	ED	E saum. (9‰)	E saum. (19‰)
T. aurea	180	178	195
T. aurea	180	194	-
T. aurea x T. nilotica	-	190	187

BIBLIOGRAPHIE

- BORNANCIN M. et DE RENZIS G. (1976). A sensitive automated method for adenosine triphosphatase kinetics. *Analyt. Biochem.* 75 : 374-381.
- CHAMPY-MAILLET (1959). In : GABE M., *Techniques histologiques*, Ed. Masson, 1968.
- CHERVINSKI J. (1982). Environmental physiology of tilapias. pp 119-128 in : R.S.V. Pullin and R.H. Lowe-Mc Connel, Eds. *The biology and culture of tilapias*. International Center for Living Aquatic Resources Management. Manila.
- DE RENZIS G. et BORNANCIN M. (1984). Ion transport and gill ATPases. *Fish Physiology*, W. S. HOAR et D. J. RANDALL Eds., Vol. X : gills, part. B : ion and water transfer
- DOUDET T. (1986). *Projet pilote de développement de l'aquaculture lagunaire (Côte d'Ivoire). Compte-rendu d'activités 1986*. Centre Technique Forestier Tropical (Nogent-sur-Marne, France).
- EPSTEIN F. H., KATZ A.I. et PICKFORD G.E. (1967). Sodium and potassium activated adenosine triphosphatase of gills : role in adaptation of teleosts to salt water. *Science*, 156 : 1245-1247.
- GARCIA-ROMEUF F. et MASONI A. (1970). Sur la mise en évidence des cellules à chlorure de la branchie des poissons. *Arch. Anat. Microsc.* , 59 : 289-294.
- KARNAKY K.J. (1980). Ion-secreting epithelia : chloride cells in the head region of Fundulus heteroclitus. *Am. J. Physiol.*, 238 : R185-198.
- LAURENT P. et DUNEL S. (1978). Relations anatomiques des ionocytes (cellules à chlorure) avec le compartiment veineux branchial : définition de deux types d'épithélium de la branchie des poissons. *C. R. Acad. Sci. Paris*, 286 : 1447-1450.
- LAURENT P. (1984). Morphologie et physiologie des organes de la respiration aquatique chez les vertébrés : la branchie. *J. Physiol. Paris*,

79 : 98-112.

MAETZ J. et BORNANCIN M. (1975). Biochemical and biophysical aspects of salt excretion by chloride cells in teleosts. *Fortschritte der Zoologie*, 23 : 322-362.

MORISSENS P. (1987). Projet de développement de la pisciculture. Rapport annuel. Centre Technique Forestier Tropical (Nogent-sur-Marne, France).

PAYNE A.I. (1984). Estuarine and salt tolerant tilapias. In proceedings, international symposium on tilapia in aquaculture. Tel Aviv University, pp 534-543.

SARGENT J.R., THOMSON A.J. et BORNANCIN M. (1975). Activities and localization of succinic dehydrogenase and Na^+/K^+ activated adenosine triphosphatase in the gills of fresh water and sea water eels (Anguilla anguilla). *Comp. Biochem. Physiol.* 51 B : 75-79.

SMITH H.W. (1930). The absorption and excretion of water and salts by marine teleosts. *Am. J. Physiol.* 93 : 480-505.

STICKNEY R.R. (1986). Tilapia tolerance of saline waters : a review. *Prog. Fish Cult.* 48 : 161-167